

Requested Patent: JP9286784A

Title: NOVEL WATER-SOLUBLE TETRAZOLIUM SALT ;

Abstracted Patent: JP9286784 ;

Publication Date: 1997-11-04 ;

Inventor(s):

ISHIYAMA MUNETAKA; MIYAZONO YOUKO; SASAMOTO KAZUMI; SHIGA
TADANOBU ;

Applicant(s): DOJIN KAGAKU KENKYUSHO KK ;

Application Number: JP19960121134 19960418 ;

Priority Number(s): JP19960121134 19960418 ;

IPC Classification: C07D257/04 ; C12Q1/32 ;

Equivalents:

ABSTRACT:

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平9-286784

(43) 公開日 平成9年(1997)11月4日

(51) Int. Cl. ⁸	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 0 7 D 257/04			C 0 7 D 257/04	E
C 1 2 Q 1/32		7823-4B	C 1 2 Q 1/32	

審査請求 有 請求項の数 2 F D (全 5 頁)

(21) 出願番号 特願平8-121134

(22) 出願日 平成8年(1996)4月18日

(71) 出願人 590005081

株式会社同仁化学研究所

熊本県上益城郡益城町田原2025-5

(72) 発明者 石山 宗孝

熊本県熊本市山の神1-5-53

(72) 発明者 宮園 祥子

熊本県菊池郡合志町豊岡2052-71

(72) 発明者 志賀 匡宣

熊本県熊本市小山町1226-39

(72) 発明者 佐々本 一美

熊本県上益城郡益城町古閑51-55

(74) 代理人 弁理士 厚田 桂一郎

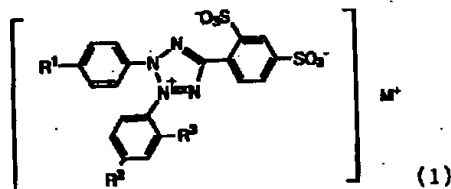
(54) 【発明の名称】 新規水溶性テトラゾリウム塩化合物

(57) 【要約】

【課題】 脱水素酵素と反応させて生成するホルマゼンの吸光度を測定する方法で、水溶性のホルマゼンを生成するテトラゾリウム化合物の水溶液安定性を改善する。

【解決手段】 一般式

【化1】



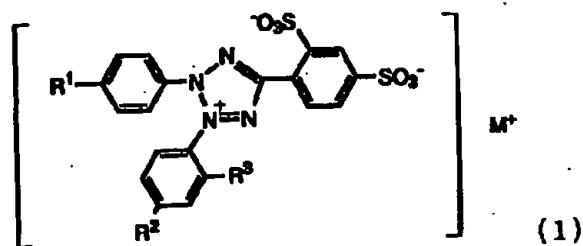
(R¹ 及び R² はそれぞれ独立に水素原子、ニトロ基、シアノ基、カルボキシ基又はハロゲン、R³ はアルキル基又はアルコキシ基、Mはアルカリ金属又はアンモニウムである) で示される安定性の優れた水溶性テトラゾリウム化合物を用いて、脱水素酵素と反応させ、生成するホルマゼンの吸光度を測定して脱水素酵素の濃度を定量する。

【効果】 得られるホルマゼンが水溶性で、測定機器への沈着がなく、自動分析装置による高感度の測定が可能であり、且つ本発明のテトラゾリウム化合物は水溶液中で安定であり臨床検査上極めて有用である。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 一般式(1)、

【化1】

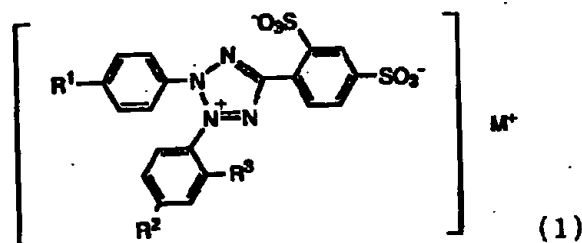


(式中、 R^1 、 R^2 はそれぞれ独立に水素原子、ニトロ基、シアノ基、カルボキシル基又はハロゲン、 R^3 はアルキル基又はアルコキシル基、 M はアルカリ金属又はアンモニウムである)で示される水溶液で安定性の優れた

新規水溶性テトラゾリウム塩化合物。

【請求項2】 テトラゾリウム塩化合物として一般式(1)、

【化2】



(式中、 R^1 、 R^2 はそれぞれ独立に水素原子、ニトロ基、シアノ基、カルボキシル基又はハロゲン、 R^3 はアルキル基又はアルコキシル基、 M はアルカリ金属又はアンモニウムである)で示される新規水溶性テトラゾリウム塩化合物を用いることを特徴とする還元型ニコチン酸アミドアデニンジヌクレオチドの定量方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は新規な水溶性テトラゾリウム塩化合物に関し、特に脱水素酵素と反応させて生成したホルマザンの吸光度により脱水素酵素並びに基質を定量分析する方法に関するものである。

【0002】

【従来の技術】乳酸脱水素酵素(以下、LDHと略称する)、アルコール脱水素酵素、グルタミン酸脱水素酵素などの各種脱水素酵素は従来テトラゾリウム塩化合物を用いて定量分析が行われていた。

【0003】すなわち、テトラゾリウム塩化合物は、これら各種脱水素酵素の作用により遊離した水素を中間電子運搬体を介して受容しホルマザンとなる。そのホルマザンの吸光度を測定することにより脱水素酵素を定量することができる。

【0004】特に、これらの脱水素酵素のうちLDHは全ての体細胞に分布し、特に心筋、肝臓、骨格筋、腎臓に多く、心筋梗塞、悪性腫瘍、肝疾患、進行性筋萎縮、血管内溶血、巨赤芽球性貧血などの疾患の場合には、血

清LDH活性が著しく上昇することが知られている。従って血中LDH活性を測定することにより、臨床上、診断に対する極めて有意義な知見を得ることができる。

【0005】また、近年、血中の尿酸や胆汁酸の測定のように、微量成分を高感度で検出するために、より生体成分の妨害を受けにくい脱水素酵素を用いる方法が望まれている。

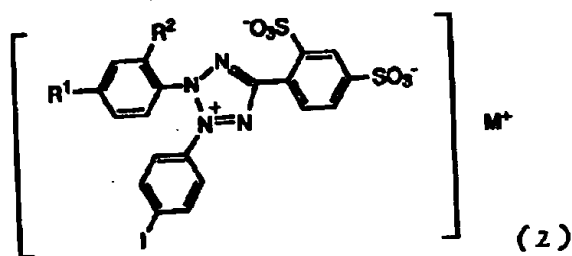
【0006】この目的の水素受容体としては、従来 3,3'-[3,3'-ジメトキシ-(1,1'-ビフェニル)-4,4'-ジイル]-ビス[2-(4-ニトロフェニル)-5-フェニル]-2Hテトラゾリウム塩化合物(以下ニトロ-TBと略称する)などが一般的に用いられている。

【0007】しかしながら、このニトロ-TBが水素を受容して生じるホルマザンは水に溶けず、実用上不便であった。特に自動分析においては、生成したホルマザンがチューブやセルなど計測系に付着し、測定値に正の誤差を与えるという問題点があった。この問題点を解決するためには、水溶性のホルマザンを生成するテトラゾリウム塩を使用することが必要となってきた。

【0008】このような問題を解決する溶解性の良好なホルマザンを生じさせる水溶性テトラゾリウム化合物として、特開平7-70092号に下記の化合物(2)が開示されている。

【0009】

【化3】



(式中、 R^1 及び R^2 はそれぞれ独立に水素原子又はニトロ基で、 M はアルカリ金属又はアンモニウムである。)

【0010】

【発明が解決しようとする課題】この化合物は得られるホルマゼンの検出感度が極めて高く、従来用いられていたニトロ-TBより高感度で、且つ水溶性であるため測定系への付着がなく、臨床検査上有用であるが、上記一般式(2)で R^1 及び R^2 がニトロ基である場合、還元型ニコチン酸アミダデニンジヌクレオチド(以下NADHと略記する)と反応させた場合の吸光度がきわめて高いにもかかわらず、この化合物を水溶液状態で保存し

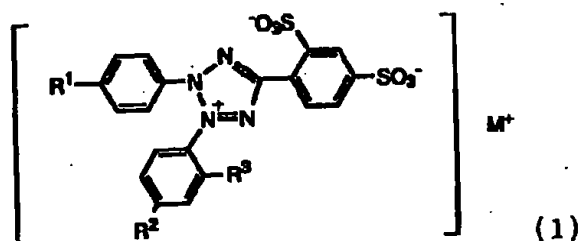
た場合の保存安定性に問題があることが判明した。臨床分析では、水溶液調整後長期にわたって、例えば3~6か月保存するため、水溶液での安定性が望まれている。

【0011】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、上記化合物(2)の高感度を維持しながら、且つ水溶液調整後の安定性を改善すべく研究を重ねた結果、下記一般式(1)の化合物に到達した。

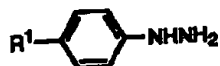
【0012】すなわち本発明の化合物は、一般式(1)、

【化4】

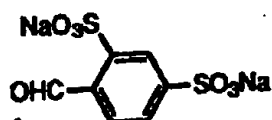


(式中、 R^1 、 R^2 はそれぞれ独立に水素原子、ニトロ基、シアノ基、カルボキシル基又はニロゲン、 R^3 はアルキル基又はアルコキシル基、 M はアルカリ金属又はアンモニウムである)で示される新規水溶性テトラゾリウム塩化合物である。

【0013】



(ここで R^1 は水素原子、ニトロ基、シアノ基、カルボキシル基又はハロゲンを表わす)で示されるヒドラジンに一般式(4)



で示されるアルデヒドをアルコール溶液中で反応させて一般式(5)

【発明の実施の形態】本発明の前記一般式(1)の化合物は常法によって製造することができる。例えば、次の一般式(3)

【0014】

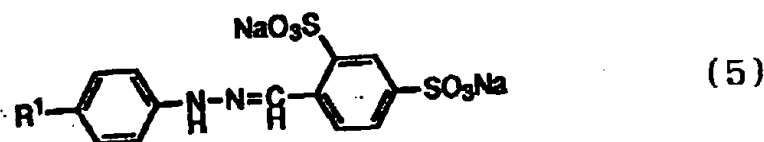
【化5】

【0015】

【化6】

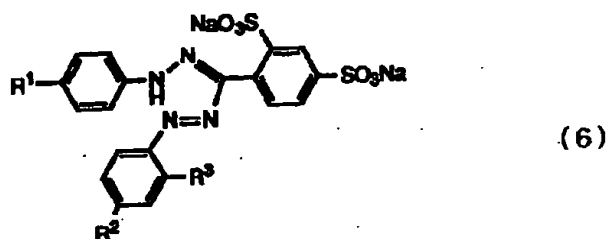
【0016】

【化7】



で示されるヒドラゾンを得、次いで対応するジアゾニウム塩を有機溶媒/水中塩基性条件下で反応させて一般式 (6)

【0017】
【化8】



で示されるホルマザンを得る。ここで、 R^1 、 R^2 はそれぞれ独立に水素原子、ニトロ基、シアノ基、カルボキシル基又はハロゲン、 R^3 はアルキル基又はアルコキシル基である。

【0018】ここで塩基性化剤としては水酸化ナトリウム、水酸化カリウムなどが用いられる。

【0019】次いで得られた一般式 (6) のホルマザンを亜硝酸ブチルなどの酸化剤を用いアルコール溶媒中で酸化し、前記一般式 (1) のテトラゾリウム塩化合物を得ることができる。

【0020】

【実施例】以下の実施例においては本発明の一般式

(1) の R^1 及び R^2 がニトロ基で、 R^3 がメトキシ基の化合物 (化合物 a) を合成し、NADH と反応させたときの吸収スペクトルを示すが、本発明はその利用につきこれらの実施例に限定されるものではない。

【0021】実施例 1

(化合物 a の合成) p-ニトロフェニルヒドラジン 18.4g と 4-ホルミル-1,3-ベンゼンジスルホン酸ナトリウム 37.2g をメタノールに混合し、2時間加熱還流した。沈殿

物を濾取し、ヒドラゾンを 85% の収率で得た。

【0022】得られたヒドラゾン 6.7g を水 200ml に溶解し、0℃ に冷却した。別に 5-ニトロ-o-アニシジン 2.7g を常法によりジアゾ化し、このヒドラゾン溶液に加えた。この反応混合溶液を -5 ~ 0℃ に保持しながら NaOH 2.6g を水 40ml に溶解した水溶液を滴下し、滴下終了後一夜室温で攪拌した。

【0023】反応混合液に塩酸を加え濃縮し、イソプロパノールを加えて生じた沈殿物を濾取し、63% の収率でホルマザンを得た。

【0024】得られたホルマザン 5g をメタノール 250ml に懸濁させ、濃塩酸 6.7ml 及び亜硝酸ブチル 4.1g を加え、室温で一晩攪拌した。反応液を濃縮し、イソプロパノールを加え、析出した沈殿を濾取し、粗生成物をエタノールで再結晶し、45% の収率でテトラゾリウム塩を得た。

【0025】得られた化合物の元素分析結果を表 1 に示す。

【0026】

【表 1】

化合物	元素分析値 (%)					
	C		H		N	
	実測値	計算値	実測値	計算値	実測値	計算値
分子式 $\text{C}_{20}\text{H}_{12}\text{N}_6\text{O}_{11}\text{S}_2\text{Na}_4$	39.78	40.00	2.15	2.18	13.76	14.00

【0027】実施例 2 及び比較例 1

化合物 a を 1mM 含有する 50mM トリス緩衝液 (pH 8.0) を 4℃ で、0、1、7、14、31、及び 90 日保存したときの 460nm における吸光度を測定した。

【0028】併せて前記特開平 7-70092 号の化合物で一般式 (2) の R^1 と R^2 がいずれもニトロ基である化合物 b についても同様に保存期間による吸光度の変化を測定した。

【0029】上記両化合物 a 及び b についての保存日数と吸光度の関係を図 1 に示す。先願化合物 b ではその吸光度は急激に上昇したが、本発明の化合物 a では 90 日間にわたって安定であった。

【0030】実施例 3 及び比較例 2

化合物 a 0.1mM 及び 1-メトキシ-5-メチルフェナジニウムメトスルフェート (以下 1-メトキシ PMS と略記する) 5 μM を含有する 50mM トリス緩衝液 (pH 8.0) 5ml

に、5mM のNADHをそれぞれ 0、10、20、30、40及び 50 μ l 加え、5分間室温で反応させた後、吸光度を測定した。NADH濃度と吸光度との関係を図2に示す。

【0031】先願化合物について同様に測定し、測定結果を図2に併記した。両化合物ともNADH濃度と吸光度との間には原点を通る直線性の検量線が得られ、その検出感度はほぼ同じであった。

【0032】比較例3

化合物aの代わりにニトロ-TBを用いて実施例3と同様に行ない、NADH濃度と吸光度の関係を求め、測定結果を実施例3における本願発明の化合物aについての結果とともに図3に示す。

【0033】

【発明の効果】本発明の水溶性テトラゾリウム化合物を用いることにより、得られるホルマザンの水溶性が向上

し、測定機器への沈着がなく、自動分析装置による測定が可能である。また、水素受容体として臨床検査で一般に用いられているニトロ-TBよりもさらに高感度でNADHの検出が可能であると共に、水溶液状態における保存性に優れ、臨床検査上極めて有用である。

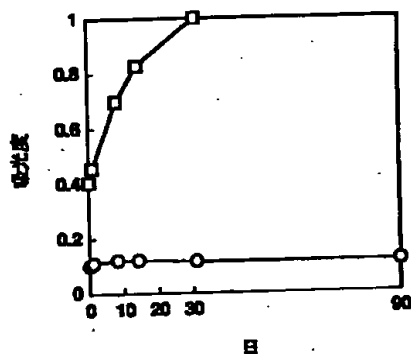
【図面の簡単な説明】

【図1】本発明の化合物a及び先願化合物bを4℃で保存した場合の吸光度変化。

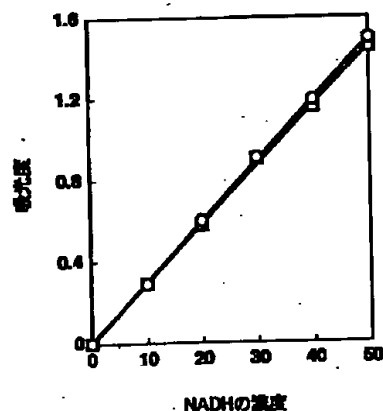
【図2】吸収スペクトル測定により得られたNADHの検量線。○は化合物aによるもので、□は先願化合物bによるものである。

【図3】吸収スペクトル測定により得られたNADHの検量線。○は化合物aによるもので、□はニトロ-TBによるものである。

【図1】



【図2】



【図3】

